

09/21,047 #6

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : 2 699 553  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 92 14821

(51) Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 15/29, 1/21, C 12 P 21/02

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) Date de dépôt : 09.12.92.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : INNOTHERAPIE LABORATOIRES  
— FR.

(72) Inventeur(s) : Dore Jean-Michel, Gras Evelyne et  
Wijdenes John.

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 24.06.94 Bulletin 94/25.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Ores.

(54) Procédé d'obtention de mutants de protéines inactivant les ribosomes, gènes mutants ainsi obtenus et leurs applications.

(57) L'invention est relative à un procédé d'obtention d'un gène codant pour une protéine toxique pour les cellules eucaryotes et non-toxique pour les cellules procaryotes, lequel comprend la mutagenèse d'un gène codant pour une protéine toxique pour les cellules eucaryotes et procaryotes, la sélection des gènes mutants dont l'expression dans une cellule procaryote autorise la croissance de ladite cellule, et une seconde sélection, parmi lesdits gènes mutants, de ceux dont le produit d'expression est toxique pour les cellules eucaryotes.

L'invention englobe également les gènes mutants obtenus par ce procédé, les cellules transformées exprimant lesdits gènes, les protéines mutantes produites par ces cellules, et leurs utilisations.

Avantageusement, l'invention s'applique à l'obtention de mutants d'une RIP de type I.

FR 2 699 553 - A1



PROCEDE D'OBTENTION DE MUTANTS DE PROTEINES INACTIVANT  
LES RIBOSOMES, GENES MUTANTS AINSI OBTENUS ET LEURS  
APPLICATIONS.

L'Invention est relative à l'obtention de  
5 mutants de protéines toxiques pour les cellules  
eucaryotes et procaryotes, en particulier de protéines  
inactivant les ribosomes, telles que la protéine  
antivirale du pokeweed (PAP), et à leur utilisation.

Un grand nombre d'espèces végétales synthéti-  
10 sent des protéines dénommées protéines inactivant les  
ribosomes (RIP), qui sont des N-glycosidases. Le pokeweed  
(*Phytolacca americana*) produit une RIP, dénommée PAP  
(protéine antivirale du pokeweed), dont 3 formes ont été  
décrites : une PAP de 29 kDa et une PAP-II de 30 kDa pro-  
15 duites par les feuilles [IRVIN et al. Arch. Biochem.  
Biophys., 200, 418-425, (1980)], ainsi qu'une PAP-S de  
30 kDa qui a été mise en évidence dans les graines  
[BARBIER et al., Biochem J., 203, 55-59, (1982)].

Les RIP reconnaissent une région hautement  
20 conservée de la surface de la sous-unité 60 S du ribosome  
eucaryote, et scindent spécifiquement la liaison entre  
A-4324 et le ribose de l'ARNr 28S. Le clivage inactive  
irréversiblement la sous-unité ribosomale, et inhibe par  
conséquent le processus de traduction. C'est par ce méca-  
25 nisme que l'on explique également les propriétés anti-  
virales de la PAP.

La PAP appartient aux RIP de type I, qui com-  
prennent une seule chaîne peptidique, contrairement aux  
RIP de type II qui en comprennent deux, dont une seule,  
30 dénommée chaîne A, possède une activité glycosidase. Une  
revue sur les RIP a été publiée récemment par STIRPE et  
al., (Bio/technology, 10, 405-412, 1992).

Les RIP agissent au niveau d'une séquence  
cible hautement conservée chez les ribosomes eucaryotes  
35 et procaryotes. Cependant, seules les RIP de type I  
possèdent la propriété d'être également actives sur les

ribosomes des eucaryotes et des procaryotes. Dans le cas de ces derniers, elles scindent la liaison entre A-2660 et le ribose de l'ARNr 23S, et préviendraient de la sorte l'interaction de A-2660 avec les facteurs d'élongation de *E. coli*, EF-G et EF-Tu, ce qui expliquerait leur effet inhibiteur sur la traduction, et leur toxicité pour *E. coli* (HARTLEY et al., FEBS Letters, 290, p. 65-68, 1991).

Il a été proposé d'utiliser les RIP pour la fabrication d'immunotoxines. Les immunotoxines sont des molécules bifonctionnelles constituées par une toxine liée à un anticorps monoclonal (Mab). L'anticorps se fixe spécifiquement aux cellules cibles portant l'épitope reconnu par lui, et la toxine pénètre dans le cytoplasme de ces cellules, provoquant leur destruction.

Les immunotoxines sont produites par couplage chimique entre l'anticorps et la toxine, et sont aussi produites par génie génétique, en fusionnant les cadres de lecture des deux peptides, afin de produire un gène chimérique, dont le produit de traduction est une protéine recombinante, où l'extrémité C-terminale d'un fragment variable monocaténaire (constitué des deux régions variables d'un anticorps reliées par un peptide neutre), est fusionnée à l'extrémité N-terminale d'une toxine.

Dans le cas des immunotoxines comprenant une RIP de type I comme la PAP, leur production par génie génétique chez *E. coli*. se heurte à l'obstacle constitué par l'activité de la RIP sur les ribosomes procaryotes.

Or, les Inventeurs ont maintenant constaté qu'il était possible d'obtenir des mutants des RIP de type I conservant la capacité d'inhiber la traduction chez les eucaryotes, mais non-toxiques pour *E. coli*. Ils ont en particulier procédé au clonage et à la mutagenèse du gène codant pour la PAP, et sont parvenus à obtenir des gènes mutants dont le produit possède une activité

similaire à celle d'une chaîne A de RIP de type II.

La présente Invention a pour objet un procédé d'obtention d'un gène codant pour une protéine toxique pour les cellules eucaryotes et non-toxique pour les  
5 cellules procaryotes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mutagénèse d'un gène codant pour une protéine toxique pour les cellules eucaryotes et procaryotes, la sélection des gènes mutants dont l'expression dans une cellule procaryote autorise la croissance de  
10 ladite cellule, et une seconde sélection, parmi lesdits gènes mutants, de ceux dont le produit d'expression est toxique pour les cellules eucaryotes.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'Invention, on procède à la mutagénèse d'un gène codant pour une RIP de type I, pour  
15 obtenir une RIP active sur les ribosomes eucaryotes et inactive sur les ribosomes procaryotes.

Selon une modalité préférée de ce mode de mise en oeuvre, la RIP de type I est la PAP. Dans l'exposé de la présente Invention, le terme PAP désigne la PAP  
20 obtenue à partir des feuilles de *Phytolacca americana* et dont le gène a été cloné par LIN et al. [Plant Mol. Biol., 17, 609-614, (1991)] ; toutefois, le procédé conforme à l'invention peut bien entendu s'appliquer aux  
25 autres formes connues de la protéine antivirale du pokeweed, qui sont également des RIP de type I.

La présente Invention englobe également les gènes mutants susceptibles d'être obtenus par le procédé conforme à l'Invention.

30 La présente Invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une bactérie transformée produisant une protéine toxique pour les cellules eucaryotes et non-toxique pour les cellules procaryotes, en particulier une RIP active sur les ribosomes eucaryotes et inactive  
35 sur les ribosomes procaryotes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mutagénèse et le clonage

dans un vecteur d'expression d'un gène codant pour une protéine toxique pour les cellules eucaryotes et procaryotes, en particulier pour une RIP de type I, suivis du transfert dudit vecteur dans des cellules bactériennes, de la mise en culture desdites cellules bactériennes dans des conditions permettant l'expression du gène cloné, pour sélectionner les clones de cellules qui poussent dans ces conditions, et de la sélection, parmi les clones cellulaires obtenus, de ceux qui expriment une protéine toxique pour des cellules eucaryotes, en particulier une RIP active sur les ribosomes eucaryotes.

La présente Invention a également pour objet les bactéries transformées susceptibles d'être obtenues par le procédé ci-dessus.

La présente Invention a également pour objet un procédé de production d'une protéine toxique pour les cellules eucaryotes et non-toxique pour les cellules procaryotes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une cellule (procaryote ou eucaryote) comprenant un gène mutant conforme à l'Invention, dans des conditions permettant l'expression dudit gène, et la purification de la protéine mutante exprimée par la cellule.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'Invention, la protéine mutante est une RIP active sur les ribosomes eucaryotes et inactive sur les ribosomes procaryotes.

La présente Invention englobe également toute RIP mutante, susceptible d'être obtenue par le procédé défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente Invention, la RIP mutante dérive de la PAP.

En particulier, la présente Invention a pour objet une protéine caractérisée en ce que sa séquence polypeptidique dérive par mutation de celle de la PAP, et comporte au moins l'une des trois mutations suivantes

- substitution en position 68 d'une arginine par une glycine;

- substitution en position 196 d'une phénylalanine par une tyrosine;

5 - substitution en position 211 d'une lysine par une arginine.

La Figure 1 représente la séquence polypeptidique de la PAP sauvage, et des mutations ponctuelles mentionnées ci-dessus sont indiquées sous cette séquence,  
10 en regard des acides aminés correspondants de la séquence sauvage.

Les protéines mutantes conformes à l'Invention ne sont pas toxiques pour E.coli ; en conséquence, les gènes clonés codant pour ces protéines, en particulier  
15 pour les RIP sont utilisables pour l'expression de ces toxines, ainsi que pour celle de toute protéine hybride recombinante comprenant lesdites toxines, telle que par exemple, des immunotoxines, dans des cellules procaryotes aussi bien que dans des cellules eucaryotes.

20 Ces gènes sont également utilisables pour l'obtention de plantes ou animaux transgéniques, afin par exemple de les rendre résistants aux infections virales en plaçant le gène codant pour la toxine mutante sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'infection  
25 virale, ou afin de détruire un type cellulaire ou un tissu particulier, en plaçant le gène sous contrôle d'un promoteur ne s'exprimant que dans ce tissu particulier.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se  
30 réfère à des exemples d'obtention de mutants de la PAP conformes à l'Invention.

#### EXEMPLE 1 : CLONAGE DE L'ADNC DE LA PAP.

Des feuilles de *Phytolacca americana* ont été récoltées et broyées dans l'azote liquide. Le broyat a  
35 été repris dans du tampon Tris-HCl 200 mM pH 9, 400 mM KCl, 35 mM MgCl<sub>2</sub>, 35 mM EDTA, à raison de 1 ml de

tampon par gramme de feuilles ; le mélange a subi une extraction au phénol. L'ARN total a été précipité à l'éthanol en présence de 0,3 M d'acétate de sodium, lavé 2 fois à l'éthanol 70% et resuspendu dans l'eau stérilisée. L'ARN poly(A) a été purifié sur une colonne  
5 de cellulose oligo-d(T).

5 µg d'ARN ont été hybridés à 5 pmoles d'oligodéoxynucleotide GCTCTAGAGAATTCAAGC(T)17 (MRNAC1) qui s'hybride avec la queue poly A de l'ARN messager.  
10 Dans cette amorce MRNA.C1, en 5' de la queue (dT)17, une séquence a été introduite afin d'incorporer des sites de restriction convenables. L'ARN a été soumis à l'action de la transcriptase inverse dans un volume total de 20 µl de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,3, 75 mM KCl, 1mM DTT, 3 mM  
15 MgCl2, 625 µM de chaque dNTP, 20 U de RNAsin and 200 U de transcriptase inverse BRL M-MLV. La synthèse de l'ADNc a été effectuée pendant 30 minutes à 35°C, 30 minutes à 42°C, et 30 minutes à 50°C.

L'ADNc obtenu a été amplifié par la méthode de  
20 la PCR. Pour les amplifications PCR, la séquence de l'amorce d'aval GCTCTAGAGAATTCAAGC (MRNA.F1) correspond à la séquence de l'amorce MRAN.C1 moins la queue d(T). L'amorce d'amont CGGGATCCATGGTIAAYACIATHATHAYAAAYGT (PAP.B1), a été déduite de la séquence en acides aminés  
25 des 8 premiers résidus de la protéine mature VNTIIYNV. Aux 2 positions où la dégénérescence était supérieure à 3, un résidu inosine a été incorporé, ce qui a abouti à une amorce dont la dégénérescence est de 72. A l'extrémité 5' de cette séquence, un site NcoI a été  
30 incorporé, introduisant un résidu méthionine en tant que codon d'initiation de la traduction.

5 µl du mélange réactionnel de transcription inverse ont été ajoutés à 45 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl2, 0,002 % (poids/volume)  
35 de gélatine, contenant 25 pmoles de chacune des amorces d'amont et d'aval, et une unité d'ADN polymérase Taq

(Perkin Elmer Cetus). Le cycle de réaction consistant en une dénaturation à 92°C pendant 1 minute, une hybridation d'amorces à 52°C pendant 1 minute, et une extension à 72°C pendant 75 secondes plus 1 seconde par cycle, a été  
5 répété 30 fois.

L'amplification par PCR fait apparaître un profil spécifique de 4 bandes. En comparant la taille de ces bandes avec le poids moléculaire de la PAP (environ 30 Kd), il apparaît que les trois produits les plus longs  
10 ont la capacité de coder pour la protéine entière. Le clonage a été effectué avec le plus petit de ces trois produits d'amplification.

La Figure 2 représente les profils des produits d'amplification obtenus en présence d'ADNc obtenu à  
15 partir d'ARN total (puits 1) ou d'ARN messenger (puits 2) préparé à partir de feuilles de *Phytolacca americana* ; ou bien (contrôle de spécificité de la réaction PCR) en présence d'ADNc obtenu à partir d'ARN extrait d'une lignée cellulaire de myélome murin (puits 3). Le marqueur  
20 de poids moléculaire (puits 4) est le produit de digestion de phage lambda par BstEII. La flèche indique la position du produit utilisé pour le clonage.

Le produit d'amplification PCR purifié sur gel a été digéré par NcoI, traité par la polymérase de Klenow  
25 et digéré par HindIII. Le vecteur de clonage pBluescript KS a été digéré par HindIII, puis par HincII. La ligation a été effectuée par incubation du vecteur et de l'insert pendant une nuit à 16°C en présence d'ADN ligase T4 (BRL), dans du tampon de ligation. Des cellules  
30 de la souche XL1-Blue de *E. coli* ont été transfectées par électroporation avec le mélange de ligation, et les clones recombinants ont été sélectionnés en présence de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) et d'IPTG (isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside) sur des  
35 boîtes contenant de l'ampicilline (50  $\mu$ g/ml) et de la tétracycline (12,5  $\mu$ g/ml).



14 clones comprenant un insert d'environ 1050 paires de bases ont été caractérisés et analysés.

#### EXEMPLE 2 : EXPRESSION DE PAP RECOMBINANTE

##### CHEZ *E. COLI*

5 Les clones comprenant la totalité du cadre de lecture ouverte de la PAP ont été digérés avec les enzymes NcoI et HindIII, et les inserts purifiés sur gel ont été introduits dans le vecteur d'expression PKK233.2 (Pharmacia) qui permet d'obtenir un niveau élevé  
10 d'expression de protéines dans le cytoplasme bactérien, digéré au préalable avec les mêmes enzymes. Le mélange a été utilisé pour transformer des cellules de *E. coli* XL1-Blues, et les clones recombinants ont été sélectionnés sur des boîtes de culture contenant de  
15 l'ampicilline (50 µg/ml) et de la tétracycline (12,5 µg/ml), cette dernière afin de bloquer l'expression de la PAP qui est toxique pour *E. coli* et par digestion avec les enzymes NcoI et HindIII.

L'influence de l'expression de la PAP sur la  
20 croissance de *E. coli* a été analysée après induction par l'IPTG.

Des cultures en présence ou en l'absence d'IPTG ont été démarrées à partir de précultures ayant poussé pendant une nuit. Pour les 14 clones étudiés, les  
25 cellules ont poussé pendant la préculture. Cependant l'analyse de la croissance de la culture a permis de classer les inserts en deux groupes. Dans 7 cas, les cellules n'étaient plus capables de pousser avec ou sans inducteur (groupe A) et dans 7 autres cas, les cellules  
30 ont poussé après addition de l'inducteur, mais à un niveau plus bas que la normale (groupe B). Dans ce même groupe B le niveau de sensibilité à l'IPTG n'est pas le même pour les différents clones, et pour deux de ces clones (clones 2 et 16) ce niveau de sensibilité est très  
35 bas. Les résultats correspondants sont représentés à la Figure 3 : la DO<sub>600</sub> a été mesurée après induction de

l'expression de la protéine (+IPTG) ou bien sans induction de l'expression de la protéine (-IPTG). Les courbes ont été établies à partir de la moyenne des valeurs obtenues avec les clones du groupe A et les clones du  
5 groupe B.

La croissance des cellules bactériennes sur milieu de culture LB, a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm. L'expression de la protéine recombinante a été induite par addition de 1 mM d'IPTG.

10 Cette sélection positive des clones non toxiques pour *E. coli* peut aussi directement être réalisée sur milieu solide, en étalant sur la boîte de culture contenant de l'ampicilline 60 µg d'IPTG avant d'étaler les bactéries transformées. L'utilisation d'une  
15 quantité trop élevée d'IPTG inhibe aussi la croissance des clones non toxiques.

L'expression de la PAP recombinante a été évaluée dans chacun des 14 clones. Pour le groupe B, une préculture d'une nuit a été utilisée pour démarrer la  
20 culture. Pour le groupe A, la culture été directement démarrée à partir du stock de bactéries conservées dans le glycérol. Les bactéries ont été cultivées jusqu'à obtention d'une  $DO_{600}$  de 0,45 préalablement à l'induction par IPTG. A partir de chacune des cultures, les protéines  
25 totales des bactéries ont été analysées sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (LAEMMLI, Nature, 227, 680-685, (1970)).

Sur les profils obtenus, la présence de la PAP recombinante peut être décelée parmi la totalité des  
30 protéines de la cellule. 5 des clones du groupe B (clones 1, 4, 9, 10, 15) produisent la PAP recombinante en quantité importante. En revanche, la PAP n'apparaît pas de façon claire sur les profils obtenus à partir des clones 2 et 16 du groupe B, et est absente des profils obtenus  
35 pour l'ensemble des clones du groupe A.

La Figure 4 montre le niveau d'expression de

PAP recombinante dans un clone contenant un insert du groupe B. Les protéines analysées sont obtenues à partir de cellules induites par l'IPTG contenant le vecteur sans insert (puits 1), de cellules contenant le vecteur avec  
5 l'insert (puits 2). La flèche indique la position de la PAP recombinante.

L'activité enzymatique des protéines codées par les clones 1, 4, 9, 10 et 15 a été testée *in vitro* sur un système de synthèse de protéines par un lysat de  
10 réticulocytes. Dans ce but, à partir de chaque culture, la fraction des inclusions cytoplasmiques contenant la PAP recombinante a été préparée comme décrit par CITOVSKY et al. (Cell., 60, pages 637-647, 1990), à l'exception de la dernière étape de solubilisation, qui a été effectuée  
15 dans un tampon contenant Tris 10 mM, pH 8, 8 M d'urée, 0,1 M de NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycérol, 1 mM DTT et 1 mM PMSF, et à une température de 4°C. Les protéines solubilisées ont été dialysées contre un tampon Tris-HCl pH 7,5 10 mM, NaCl 0,1 M afin de les renaturer, puis  
20 centrifugées. Le surnageant a été analysé sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes pour estimer la quantité relative de PAP recombinante utilisée pour chaque test d'activité.

Les tests d'activité des PAP produites par les  
25 différents clones sur la synthèse des protéines *in vitro* a été effectuée en utilisant le "Kit réticulocyte de type II" de BOEHRINGER, et une matrice d'ARN du virus de la mosaïque de la luzerne. Les réactions ont été effectuées dans 12,5 ml de mélange réactionnel, contenant 1 µg d'ARN  
30 viral, 10 µCi de méthionine marquée au soufre 35, (Amersham) et 1 µl de PAP dilué au 1/10 dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 0,1 M. Dans certaines expériences, les réticulocytes ont d'abord été incubés pendant 20 minutes en présence de PAP avant le début de  
35 la synthèse de protéines. La synthèse de protéines a été effectuée à 30°C pendant 30 minutes.

Les résultats de ces tests sont représentés à la Figure 5 :

- 5A : Analyse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, des mutants de la PAP utilisés pour le test d'activité.

Les échantillons analysés contiennent des protéines renaturées de la fraction des inclusions préparées à partir de cellules contenant le vecteur sans insert (puits 2), ou l'insert PAP1 (puits 3), PAP4 (puits 4), PAP9 (puits 5), PAP10 (puits 6), PAP15 (puits 7). Le puits 1 contient des marqueurs de poids moléculaire.

- 5 B : Autoradiographie des protéines synthétisées *in vitro* après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

La synthèse de protéines a été initiée directement (B1), ou bien le lysat de réticulocytes a été d'abord préincubé avec la préparation de PAP à tester (B2). Dans ces conditions, ont été testés le tampon de dialyse utilisé pour la renaturation (puits 1), les protéines renaturées de la fraction des corps d'inclusion préparés à partir de cellules contenant le vecteur sans insert (puits 2), ou avec l'insert PAP1 (puits 3), PAP4 (puits 4), PAP9 (puits 5), PAP10 (puits 6), PAP15 (puits 7).

Les résultats obtenus montrent que les protéines codées par les clones 4 et 15 n'ont aucune influence sur la synthèse des protéines *in vitro* dans le système de réticulocytes. En revanche, 3 des autres protéines inhibent la synthèse protéique (PAP1, 9 et 10). Ce sont les clones PAP1 et 9 qui ont l'activité la plus élevée. L'activité de PAP10 n'apparaît que si l'on procède auparavant à une préincubation de la PAP obtenue à partir de ce clone avec les extraits de réticulocytes, avant l'initiation de la synthèse des protéines, (Figure 5) ou bien quand la préparation de PAP est